

Titaanista valmistetun hammasimplantin pinnoittaminen antimikrobiaaliseksi ja osseointegraatiota edistäväksi

Heikki Hänninen

Opiskelija

Helsingin yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen lisensiaatin tutkinto

Ohjaaja: Kaija Hiltunen

Ohjaajan yhteystiedot: kaija.hiltunen@helsinki.fi

Protetiikka ja purentafysiologia, Suu- ja leukasairauksien osasto, Helsingin yliopisto

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Suu- ja leukasairauksien osasto	
Tekijä – Författare – Author Heikki Hänninen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Titaanista valmistetun hammasimplantin pinnoittaminen antimikrobiaaliseksi ja osseointegraatiota edistäväksi			
Oppiaine – Läroämne – Subject Protetiikka ja purentafysiologia			
Työn laji - Arbetets art – Level Syventävien opintojen opinnäytetyö	Aika – Datum – Month and year 1/2020	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 28	
<p>Tiivistelmä - Referat – Abstract</p> <p>Hammasimplanttien käyttö on yleistynyt hampaiden korvaamisessa. Implanttien materiaalina käytetään titaania ja titaaniseoksia näiden mekaanisten ominaisuuksien, vähäisen toksisuuden ja korroosioresistenttiyden vuoksi, minkä lisäksi kyseisten materiaalien on todettu olevan bioyhteensopivia luusolujen kanssa. Implantit ovat kuitenkin alttiita infektioille, jotka voivat johtaa implantin menettämiseen.</p> <p>Antifouling-materiaalit estävät mikrobien kiinnittymistä pintoihin kosteissa oloissa, kuten suussa. Tässä kirjallisuustutkimuksen muotoisessa tutkielmatyössä esitellään titaanista valmistetuille hammasimplanteille suunniteltuja potentiaalisia antifouling-pinnoitemateriaaleja, jotka myös edistävät osseointegraatiota eli implantin luutumista. Lisäksi määritellään näiden materiaalien yleisimmät analysointimenetelmät, implantointiin vaikuttavia tekijöitä, keskeinen anatomia ja fysiologia.</p> <p>Opinnäytetyön viitteet haettiin suurimmaksi osaksi Scopus-tietopankin ja Google Scholarin kautta. Tutkimustulosten ja artikkelien valintakriteereinä olivat muun muassa sekä luutumisen että antimikrobiaalisuuden huomioiminen pinnoitettujen, titaanista valmistettujen hammasimplanttien in vivo - tai in vitro</p>			

-tutkimuksissa. Useimmissa hakusanoilla löydettyissä artikkeleissa nimittäin vain toista tekijää tutkittiin: joko luutumista tai antimikrobiaalisuutta, muttei molempia. Artikkelien rajaamiseen käytettyjä hakusanoja olivat muun muassa titanium, dental, implant, coating, antifouling, antimicrobial, biocompatibility ja osseointegration. Hammasimplantointiin liittyvän keskeisen anatomian ja fysiologian esittämiseksi lähteinä käytettiin parodontologiaan ja suu- ja leukakirurgiaan keskittyvää kirjallisuutta.

Useita eri potentiaalisia pinnoitemateriaaleja on kehitetty. Johtopäätöksenä voidaan kuitenkin todeta, ettei yhtä tutkielmassa esitellyistä hammasimplantin pinnoitemateriaaleista voida asettaa ylitse muiden, sillä materiaaleja ei ole vertailtu keskenään. Harvoista pinnoitteista oli tehty klinisiä tai pitkäkestoisia tutkimuksia, mikä myös esti pinnoitteiden paremmuusvertailun tekemistä.

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

Antifouling, Coating, Antimicrobial, Dental implant, Osseointegration

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Tiedekunnan kanslia toimittaa Terkkoon. Opiskelija tallettaa sähköisen version Heldaan.

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

Sisällysluettelo

1 Johdanto.....	1
2 Osseointegraatio.....	3
2.1 Pehmytkudosrajapinta	3
2.2 Osseointegraatio.....	4
2.3 Kovakudoksen paraneminen.....	5
3 Implantoinnin onnistumiseen vaikuttavia tekijöitä	7
3.1 Bakteerit ja biofilmien muodostus.....	7
3.2 Hammasimplantin pintaominaisuudet ja kestävyys	9
3.3 Muut tekijät	11
4 Antifouling–pinnoitemateriaalien analysointi.....	12
4.1 Hammasimplantin standardivaatimukset ja käytäntö uusien pinnoitteiden analysoinnissa	12
4.2 Sytotoksisuus.....	15
4.3 Antimikrobisuus	16
4.4 Bioaktiivisuus	17
4.5 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	18
4.6 Biofilmin muodostuminen	18
5 Hammasimplantteihin sopivat antifouling-pinnoitemateriaalit	20
5.1 Titaanipinnoitteet.....	20
5.2 Hiilestä valmistetut pinnoitteet.....	20
5.3 Bifosfonaatit	21
5.4 Hydroksiapatiitti ja muut kalsiumfosfaattipinnoitteet	21
5.5 Polyetyleeniglykolipinnoitteet	22
5.6 Antibiootteja vapauttavat pinnoitteet	22
5.7 Ei-antibioottiset antimikrobiset tekijät pinnoitteissa	24
5.8 Antibakteeriset bioaktiiviset biopolymeerit	25

5.9 Eri materiaaleja yhdistävät pinnoitteet	26
6. Yhteenveto.....	27
Lähdeluettelo	29

1 Johdanto

Tämä syventävien opintojen tutkielmaksi tarkoitettu opinnäytetyö on tehty yhteistyössä Aalto-yliopiston kanssa. Tässä tutkielmassa jatkan Aalto-yliopiston Kemian tekniikan korkeakoulussa kirjallisuuskatsauksen muodossa kirjoittamaani kandidaatintyötä, ”Antifouling-pinnoitemateriaalien käyttäminen titaanista valmistetuissa hammasimplanteissa”. Tämä laajennettu työ esittelee tarkemmin hammasimplanttia ympäröivän kudoksen anatomiaa, hammasimplantin luutumisen fysiologiaa sekä luutumiseen vaikuttavia tekijöitä.

Hampaiden menetyksen on todettu assosioituvan suun terveyteen liittyvän elämänlaadun (Oral health-related quality of life, OHRQoL) heikkenemiseen (1). Implanttien katsotaan parantavan yleensä OHRQoL:ia hampaita menettäneillä potilailla, vaikka parannus ei välttämättä ole suurempi verrattuna konventionaaliseen protetiikkaan (2). Implanttien materiaalina käytetään titaania ja titaaniseoksia näiden mekaanisten ominaisuuksien, vähäisen toksisuuden ja korroosioresistenttiyden vuoksi. Lisäksi titaanin on todettu olevan yhteensopiva materiaali luusolujen kanssa. Edellä mainituista ominaisuuksista huolimatta titaani-implantit ovat alttiita infektioille, minkä oletetaan olevan yksi tärkeimmistä syistä implanttihampaan menettämiseen pitkällä aikavälillä (3). Hampaan ja ikenen välillä olevat parodontaaliligamentit eristävät luun suun bakteereista, mutta implantin pintaan kyseisiä säikeitä ei kiinnity. Implantin ja hammasluun välin sulkeminen biologisesti on siten erityisen tärkeää implantoinnin onnistumisen kannalta, koska alveoliluun infektioriski kasvaa suuresti implantoinnin seurauksena (4).

Antifouling-pinnoitteita ovat esimerkiksi lääkeaineita tai antimikrobiaalisia tekijöitä, kuten kuparia sisältävät materiaalit, jotka estävät mikrobien kiinnittymisen pintoihin kosteissa oloissa. Tähän liittyvää materiaalioppia voidaan soveltaa lääketieteeseen, jossa antifouling-materiaaleilla pyritään vaikuttamaan

implantoinnin kannalta keskeisessä asemassa oleviin tekijöihin kuten bakteeri-infektioiden estoon (5,6). Tässä syventävässä tutkielmassa tarkastellaan titaanista valmistetuissa hammasimplanteissa käytettäviä ja niihin mahdollisesti sovellettavia antifouling-pinnoitemateriaaleja sekä näiden ominaisuuksia ja toimivuutta in vitro - ja in vivo -tutkimusten perusteella. Tutkimustulokset ja työhön käytetyt viitteet on haettu suurimmaksi osaksi Scopus-tietopankin ja Google Scholarin kautta. Artikkelien valintakriteereinä olivat muun muassa sekä luutumisen että antimikrobiaalisuuden huomioiminen pinnoitettujen, titaanista valmistettujen hammasimplanttien in vivo - tai in vitro -tutkimuksissa, sillä useimmissa hakusanoilla löydettyissä artikkeleissa vain toista tutkittiin: joko luutumista tai antimikrobiaalisuutta, muttei molempia. Tässä syventävässä tutkielmassa on lisäksi käytetty lähteinä parodontologiaan ja suu- ja leukakirurgiaan keskittyvää kirjallisuutta.

Aluksi esitetään hammasimplantin luutumiseen liittyviä fysiologisia tapahtumia sekä havainnoillistetaan implanttia ympäröiviä anatomisia rakenteita. Toisessa luvussa taustoitetaan puolestaan tekijöitä, jotka vaikuttavat implantoinnin onnistumiseen. Seuraava luku käsittelee keskeisimpiä antifouling-materiaalien analysointimenetelmiä, minkä lisäksi lukuun on koottu hammasimplantin standardivaatimukset. Neljännessä luvussa esitellään puolestaan potentiaalisimpia antifouling-materiaalivaihtoehtoja hammasimplanttien päällystämiseksi ja lopuksi esitetään yhteenveto käsitellyistä aiheista.

2 Osseointegraatio

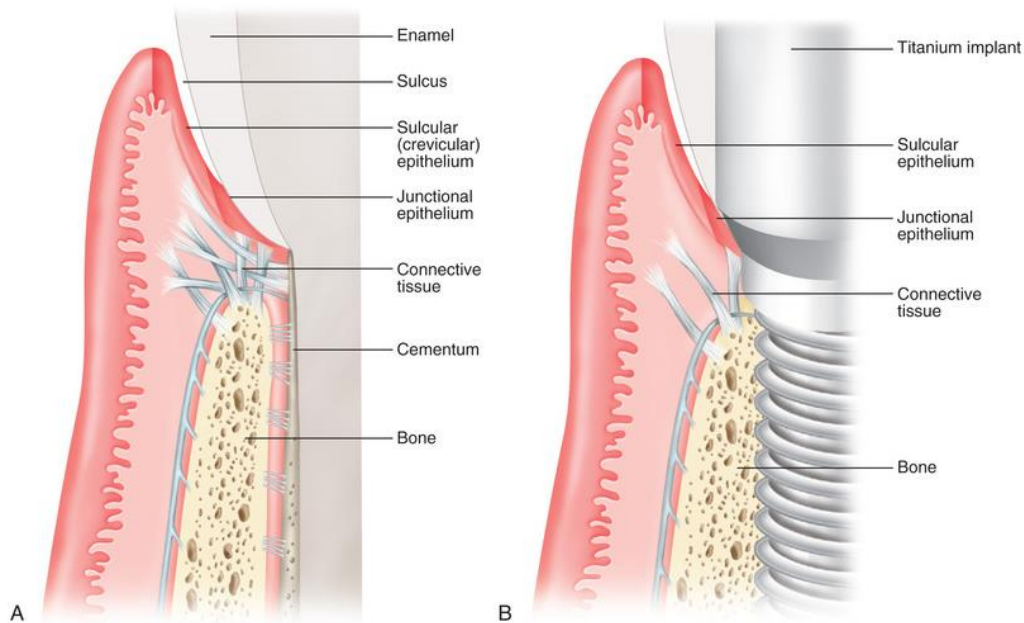
Tässä luvussa esitetään hammasimplantin ympäröivän kudoksen anatomiaa sekä fysiologisia tapahtumia, joiden seurauksena titaanista valmistettu hammasimplantti osseointegroitu eli luutuu leukaluuhun.

2.1 Pehmytkudosrajapinta

Implantin ympärillä oleva pehmytkudos on pitkälti ulkoisesti ja rakenteellisesti parodontaalista pehmytkudosta vastaava. Molemmissa kudokset koostuu sulkulaarisen epiteelin päällystämästä, leukaluun päällä olevasta sidekudoksesta sekä sulkulaarisen ikenen alueella olevasta liitosepiteelistä (7). Toisin kuin hampaaseen, implantaattiin ei kuitenkaan kiinnity parodontaaliligamentteja, vaan implantaatti on suorassa kontaktissa luuhun, kuva 1. Implantin ympärillä kulkee kuitenkin kollageenisäikeitä, lähinnä yhdensuuntaisesti implantin pinnan kanssa (8).

Implantoinnissa vaurioituneella epiteelillä on luontainen kyky uudistua. Proliferaation ja migraation sekä näihin liittyvän kontakti-inhibition (contact inhibition) avulla se palauttaa muotonsa. Kontakti-inhibition periaattein epiteeli jatkaa kasvuaan, kunnes se kohtaa toisen epiteelireunan. Tutkijat ovat kuitenkin todenneet, että epiteelin migraatio inertin vieraan materiaalin pintaa pitkin kohti luuta pysähtyy ja epiteeli luo biologisen liitoksen implantin pinnan kanssa (9). Kuten luonnonhampaissa, epiteelisolut kiinnittyvät implantin pintaan hemidesmosomein ja basaalisen laminan avulla. Tämä liitosepiteeli on jatkuva sulkulaarisen epiteelin kanssa (8) ja tavallisesti liitosepiteelin kiinnittyminen implantaattiin on noin 1,5 – 2 mm luurajan yläpuolella (10). Kanin ja kollegoiden tutkimuksen mukaan 45 ihmisen etualueen implantin pehmytkudoksen biologisen leveyden mitaksi saatiin 6,17 mm mesiaalisesti, 3,63 mm ja 5,93 mm distaalisesti (11). Suorassa kontaktissa implantin kanssa olevassa sidekudoksessa on tyypillisesti vähän verisuonia, mutta suuri määrä fibroblasteja kollageenisäikeiden välissä. Lateraalisesti tästä, verisuonten ja kollageenisäikeiden määrä

puolestaan kasvaa ja fibroplastien määrä laskee. Junktionaalisen ja sulkulaarisen epiteelin alla oleva sidekudoksen verisuonitus sekä implanttia ympäröivä mukoosa vastaavat morfologisesti hammasta ympäröiviä kudoksia, minkä lisäksi ne reagoivat samalla tavalla plakin muodostumiseen (7,12).



Kuva 1. Pehmytkudos- ja kovakudosrajapinnat hampaan ja implantin tapauksissa (8).

2.2 Osseointegraatio

Histologisesti osseointegraatio on määritelty rakenteellisena ja funktionaalisena yhteytenä elävän luun ja painetta kestävän elottoman materiaalin, implantin, välillä ilman näiden välissä olevaa pehmytkudosta. Kliinisesti voidaan todeta, ettei osseointegroituessa implantissa ilmene liikkuvuutta ja että se kestää puremisesta aiheutuvia erisuuntaisia voimia (7). Osseointegraatio koostuu ajallisesti eri vaiheista, jotka sisältävät luun muokkausta ja uudelleen muokkausta. Luutumisen onnistuminen riippuu muun muassa implanttia ympäröivän luun määrästä ja laadusta. Nämä ominaisuudet määräytyvät

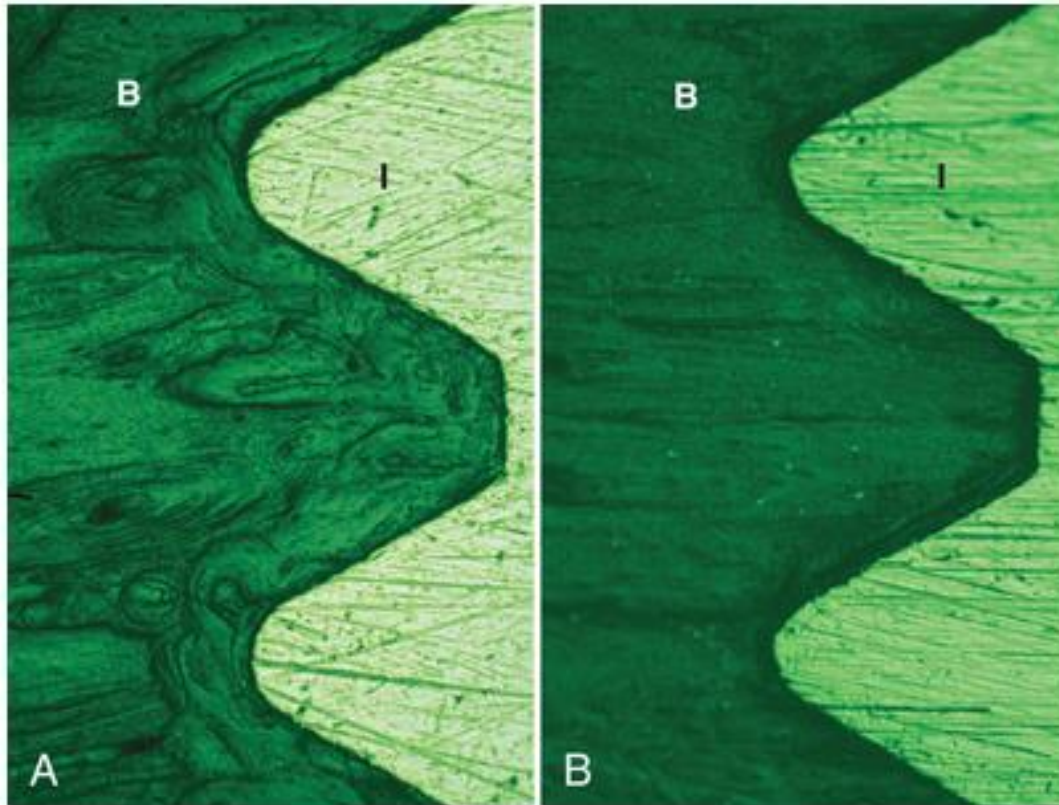
puolestaan implantissa käytetyistä materiaaleista, implantin muodosta ja pintarakenteesta sekä implantointiin sovelletusta kirurgisesta tekniikasta, joka vaikuttaa implanttia ympäröivän luun pinta-alaan. Pitempiaikainen implantin ennuste vaatii lisäksi proteettisen rakenteen helppoa puhdistettavuutta, muotoilua ja purennasta aiheutuvien voimien kontrollointia (3). Näistä kerrotaan lisää luvussa kolme.

2.3 Kovakudoksen paraneminen

Hammasimplantin luutuminen muistuttaa pitkälti luunmurtuman parantumista ja se koostuu kolmesta vaiheesta: hohkaluun muodostuksesta, tiiviin ja paralleelikuittaisen luun muodostuksesta ja lopulta luun remodelaatiosta. Solunesteen paljastuessa solunulkoiselle nesteelle implantoinnin aiheuttaman trauman vuoksi ei-kollageeniset proteiinit ja kasvutekijät vapautuvat, jolloin myös tulehdusreaktio, luun resorptio ja osteoprogeniittorisolujen järjestäytynyt kerääntyminen alueelle aktivoituvat. Osteoprogeniittorisolut erilaistuvat osteoblasteiksi, jotka muodostavat soluvälitilan proteiinien, kuten osteokalsiinien, säätelämänä implanttien ympärille uutta luuta alkaen hohkaluusta (7,9,13).

Hohkaluu kasvaa kaikkiin suuntiin nopeasti. Se koostuu sattumanvaraisesti orientoituneista kollageenifibrilleistä, suuresta solumäärästä ja matalahkosta mineralisaatioasteesta, minkä vuoksi sillä on kohtuullisen heikko biomekaaninen kestävyys. Hyvin organisoitu, pitkittäisiä kerroksia sisältävä sekä tiiviin mineralisaatioasteen omaava lamellaarinen luu tai hohkaluun ja lamellaarisen luun välimuoto, paralleelikuittainen luu, alkavat korvata hohkaluuta 4-6 viikon jälkeen hitaasti. Lamellaarisen luun ja hohkaluun histologinen poikkileikkaus implantin yhteydessä on esitetty kuvassa 2 (7,13). Osseointegraation viimeinen vaihe, luun lopullinen adaptaatio ympäröiviin voimiin implantin kuormituksen jälkeen, alkaa yleensä noin kolmannen kuukauden jälkeen implantoinnista. Tässä remodelaatioissa nekroottinen ja mahdollinen jäljellä oleva primitiivinen hohkaluu korvautuvat lamellaarisella luulla sekä luun rakenteen dimensiot ja tukirakenteiden orientaatiot muuttuvat kestävämmän paremmin ympäröivää kuormitusta (13).

Implantin primaaristabiliteetti saadaan aikaan implantaation yhteydessä ja se riippuu implantin asennosta, pituudesta, halkaisijasta ja upotussyvyydestä, minkä lisäksi siihen vaikuttaa myös ympäröivän luun tiheys ja määrä (14-16). Sekundääristabiliteetti on puolestaan riippuvainen implantin pinnan mikromorfologiasta sekä ympäröivän luun laadusta ja määrästä (7,16).



Kuva 2. Vasemmalla olevan hohkaluun (A) epäsäännöllinen kollageenikuviointi ja tiiviin luun (B) säännöllinen lamellirakenne implanttia vasten (7).

3 Implantoinnin onnistumiseen vaikuttavia tekijöitä

Tässä luvussa esitetään suussa yleisesti esiintyviä bakteereja ja niiden tapaa vaikuttaa hammasimplantoinnin onnistumiseen. Lisäksi käsitellään implantin pintaominaisuuksien vaikutusta muun muassa luutumsvasteeseen sekä kerrotaan toimivan hammasimplantin ominaisuuksista.

3.1 Bakteerit ja biofilmien muodostus

Suussa elävät bakteerit muodostavat biologisen uhan implantin ennusteelle. Merkittävä osuus komplikaatioista, jotka johtavat implantin poistoon, aiheutuu bakteereista ja niiden muodostamista biofilmeistä (17). *Streptococcus mutans* on yksi suun yleisimmistä tauteja aiheuttavista bakteereista ja sitä havaitaan usein kariksen, limakalvontulehduksien ja parodontaalitautien yhteydessä. *Staphylococcus aureus* on puolestaan yksi yleisimmistä tautien aiheuttajista koko ihmisessä ja se voi aiheuttaa suun pehmytkudosten infektion kautta muun muassa verisuoni-infektioita, keuhkokuumetta sekä luu- ja nivelinfektioita (18).

Biofilmin synty alkaa bakteerien kiinnittymisellä hampaan pinnalle adsorboituneisiin syljen komponentteihin (17). Biofilmin muodostuksessa *Streptococcus sanguinis* toimii ensimmäisenä kiinnittyvänä bakteerina, joka myös edistää muiden bakteerien, kuten *Lactobacillus salivariuksen* kiinnittymisen. Lopulta oraalibiofilmi koostuu yli 500 eri bakteerilajista ja näiden tuottamista polymeeristä aineista, joiden avulla bakteerit kiinnittyvät toisiinsa, ympäristöön ja alla olevaan materiaaliin (19).

Biofilmeissä olevat bakteerit ovat vastustuskykyisempiä antimikrobisille tekijöille kuin planktoniset eli kiinnittymättömät bakteerit, minkä vuoksi antibioottihoidot ovat yleensä kykenemättömiä hoitamaan implantti-infektiota. Isännän tuottama puolustusreaktio bakteeri-infektiossa saa aikaan pehmytkudosten tulehtumisen ja implanttien tapauksessa tätä kutsutaan mukosiitiksi. Infektoituneiden

implanttien hoitaminen on vaikeaa, sillä useimmat bakteereista ovat kasvuvaiheen stationääritilassa, joten niiden aineenvaihdunta on hidasta. Antibioottien teho on tällöin heikko. Implantti voi täten muodostaa kasvaneen riskin yleisen terveyden heikentymiseen, minkä vuoksi implantteja pyritään kehittämään mikrobeja hylkiviksi (20). Vielä ei ole keksitty tapaa eliminoida tapahtunutta infektiota, joten useimmiten ainoa tehokas keino ratkaista ongelma on implantin poisto (21). Tästä syystä bakteerien adheesion estäminen heti implantoinnin alkuvaiheessa on erityisen tärkeää implantin ennusteen pidentämiseksi.

Bakteerien kiinnittymistä implantteihin voidaan inhiboida esimerkiksi orgaanisten lääkkeiden avulla, muuttamalla titaani-implantin pinnan fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia tai päällystämällä implantti polymeerein. Lääkkeisiin perustuvassa pinnoituksessa käytettävät antimikrobiset tekijät voidaan jakaa antibioottitekijöihin, ei-antibioottisiin tekijöihin sekä antimikrobiaalisiin peptideihin. Huolena on kuitenkin joidenkin lääkkeiden käyttöturvallisuus, kuten myös bakteerien antibioottiresistenssin muodostuminen. Implantin fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia voidaan puolestaan muokata lisäämällä sen pinnalle antimikrobiaalisia tekijöitä, esimerkiksi sinkkiä, kuparia tai jodia tai vaihtoehtoisesti muuttamalla implantin titaanioksidipinnan kristallirakennetta. Polymeeripäällystys sen sijaan perustuu mikrobien karkottamiseen, jolloin pinnoitetta kutsutaan biopassiiviseksi, tai vaihtoehtoisesti mikrobien tappamiseen, jolloin pinnoite on bioaktiivinen (20).

Bakteriaallinen infektio voi puolestaan viivyttää osseointegraatiota vaikuttamalla implanttia ympäröivän kudoksen soluihin (22). Implantin asettaminen tapahtuu suussa, joka ei ole steriili ympäristö. Tällöin parodontaalipatogeenit tunkeutuvat implantin pinnalle kirurgisessa toimenpiteessä ja ”kilpailu pinnoista” (”the race for the surface”) alkaa ennen pehmytkudosten integraatiota (23). Kilpailussa siis mikrobien adheesio ja biofilmin muodostuminen taistelevat solujen kiinnittymistä ja kudosisntegraatiota vastaan. Mikäli bakteerit voittavat kilpailun, implantin pinta

päällystyy nopeasti biofilmistä, jolloin kudossolujen toiminnot heikentyvät bakteerien virulenssitekijöiden ja toksiinien vuoksi (22). Vaikka kudosintegraatio onnistuisi, implantin alueen puolustuskyky bakteereja vastaan on edelleen heikko, mikä johtuu alueen vähäisestä verisuonimäärästä (21). Antibakteriaalinen ja soluadheesiota edistävä implantin pinnoitemateriaali parantaa siten implantin pitkäaikaisen osseointegraation onnistumisen todennäköisyyttä (22).

Materiaalin bioaktiivisuutta voidaan ennustaa in vivo ja in vitro Kokubo-käsittelyn avulla: mikäli materiaalin pinnalle muodostuu simuloidussa kudostenesteessä (simulated body fluid, SBF) hydroksiapatiittia (ha), materiaali on bioaktiivinen (24). Materiaalien eri ominaisuuksien analysoinnista kerrotaan enemmän luvussa kolme. Hammasimplantin pinnan ominaisuudet, kuten pinnan karkeus, pintavaraus, pintaenergia ja kemiallinen kompositio vaikuttavat merkittävästi osseointegraatioprosessiin (24), mistä seuraavassa alaluvussa kerrotaan tarkemmin.

3.2 Hammasimplantin pintaominaisuudet ja kestävyys

Hammasimplantin pinnoitteen tulisi edistää solujen kiinnittymistä, erilaistumista ja luun muodostusta. Hammasimplantin pinnan laatu voidaan arvioida mekaanisten, topografisten ja fysiokemiallisten ominaisuuksien osalta: mekaaniset ominaisuudet vaikuttavat implantin kovuuteen ja pinnan kestävyYTEEN, topografiset ominaisuudet kertovat pinnan epätasaisuuksista ja fysiokemialliset ominaisuudet antavat tietoa pintaenergiasta ja -varauksesta. Tutkimusten perusteella Albrektssonin ja Wennerbergin asteikon mukaan kohtalaisen karkeilla pinnoilla ($S_a = 1\text{--}2\ \mu\text{m}$) on sileämpiä ($S_a < 0,5\ \mu\text{m}$) ja karkeampia ($S_a > 2\ \mu\text{m}$) pintoja parempi luutumisvaste, millä ei kuitenkaan ole tilastisesti suurta merkitystä (3). Goyal ja hänen työkollegansa totesivat puolestaan pintojen karkeuden kasvaessa implantin pinta-alan kasvavan, solumigraation ja adheesion alueelle lisääntyvän sekä osseointegraation parantuvan samanaikaisesti (24).

Hammasimplantin pintaa voidaan muokata pinnoitteen avulla tai vaihtoehtoisesti subtraktiivisesti, jolloin pintaa hiotaan esimerkiksi hiekan tai happojen avulla. Happohiontaa käytetään erityisesti titaanimetalliseoksesta valmistettujen implanttien pintakarkeuden muuttamisen lisäksi pintakoostumuksen modifioimisessa sekä vaikuttamaan pinnan kostuvuuteen ja energiaan (24). Pinnan kostuvuus vaikuttanee proteiinien kiinnittymisen kautta soluadheesioon: pinnan kostuvuuden vähentyminen huonontaa proteiinien kiinnittymiskykyä ja -voimaa. Lisäksi vähentynyt kostuvuus voi muuttaa adsorboituneiden proteiinien konformaatiota, jolloin proteiinien solureseptoriligandin tunnistaminen vaikeutuisi. Täten pinnan kostuvuuden lisääminen edistää esimerkiksi tärkeänä tekijänä haavan paranemisessa olevien fibroblastien kiinnittymistä (25).

Pinnan subtraktiivisen muokkauksen ja samalla puhdistuksen avulla mahdollistetaan pinnoitteen parempi kiinnittymiskyky implanttiin (24). In vivo -tutkimusten perusteella titaanin käsittely UV-valolla johtaa progressiiviseen hiilivetyjen poistoon Ti_2O_2 -pinnasta, mikä parantaa pinnan osteokonduktiivisuutta eli kykyä stimuloida uuden luun muodostusta materiaalin pintaan (26). Bakteriaalista kiinnittymistä voidaan puolestaan merkittävästi vähentää muuttamalla titaanioksidipinnan kristallirakennetta anastaasi-tyyppiseksi titaanioksidikerrokseksi. Tämä ei tutkimusten mukaan vaikuta negatiivisesti pintaa ympäröivien solujen metaboliaan, vaan voi jopa stimuloida apatiitin muodostumista simuloituissa kehon nesteissä, mikä puolestaan indikoi osteokonduktiivisuuden parantumista (27).

Pinnoitteen täytyy kestää ja kyetä siirtämään implanttiin kohdistuvat voimat ympäröiviin kudoksiin. Näitä implantin ja luun välisiä voimia syntyy materiaalien elastisuuserojen vuoksi, jolloin voimien kasvaessa pinnoitetta sitovia voimia suuremmiksi pinnoite saattaa irrota implantin pinnalta (28). Tästä syystä pinnoitteen paksuudella on myös merkitystä: Tutkimusten mukaan paksu kalsiumfosfaatista valmistettu pinnoite titaani-implantin päällä estää implantin sitoutumisen ympäröiviin kudoksiin, minkä lisäksi pinnoitteen sisäinen rakenne

on heikko ja murtuma-altis. Erittäin ohut kerros kalsiumfosfaattia puolestaan lisää osseointegraatiota (3).

Implanttien pinnoitukseen käytettävät bioaktiiviset molekyylit pyrkivät optimoimaan kudosten biologisen vasteen implanttia kohtaan. Ihanteellisessa tilanteessa osteoblastien eli luuta muodostavien solujen kypsyminen stimuloituu edistään osseointegraatiota ja bakteeriaten adheesio on minimoitu (22). Pinnoitukseen käytettäviä materiaaleja on eritelty luvussa neljä.

3.3 Muut tekijät

Mikäli kovakudosrajapinnassa esiintyy yli 150µm liikettä tai riittämättömän verisuonituksen vuoksi hapetus-pelkistys-potentiaali ei ole suosiollinen, osteoblastien erilaistuminen heikentyy ja arpikudosta muodostuu luun ja implantin välille. Edellä mainituissa tilanteissa pehmytkudos ei koskaan korvautu luulla. Epiteelisolumigraatio ei myöskään välttämättä pysähdy implantin pintaan, vaan se voi jatkua kontakti-inhibition periaattein vertikaalisesti kohti alveoliluuta. Tämä puolestaan johtaisi implantin puutteelliseen osseointegraatioon, minkä vuoksi paranemisen alkuvaiheessa esimerkiksi liiallinen purentapaine on haitallista (7,9,13). Näistä syistä johtuen luun muodostumisen on alettava ennen pehmytkudosten muodostumista implantin ja luun väliin, mitä edistää muun muassa implantin liikkumattomuus ja siten implantin ja alveoliluun välisen tilan vähäisyys. Implantin rajoitettu kuormitus alustavien integraation jälkeen nopeuttaa puolestaan luutumista. Lähinnä implanttia olevan luun nekrotisoitumisen minimointi implantoinnin yhteydessä aiheutuneesta vaskulaarisesta ja termallisesta traumasta nopeuttaa myös luutumisen alkamista. Kliinikot ovat todenneet eräissä tilanteissa mahdolliseksi selektiivisesti nopeuttaa luunmuodostusta esimerkiksi huokoisilla membraaneilla, jotka päästävät lävitse ravinteita ja happea, mutta estävät fibroblastien ja muiden kudoselementtien kulun membraanin läpi. Näiden lisäksi implantin pitäminen suhteellisen kontaminaatiovapaana epäorgaanisesta ja orgaanisesta materiaalista, kuten öljystä ja vierasproteiineista kasvattaa luutumisenopeutta (9).

4 Antifouling–pinnoitemateriaalien analysointi

Tässä luvussa esitetään lyhyesti potentiaalisten antifouling-pinnoitemateriaalien eri analysointimenetelmiä. Materiaalin käyttöönoton standardivaatimuksista mainitaan myös lyhyesti heti seuraavassa alaluvussa.

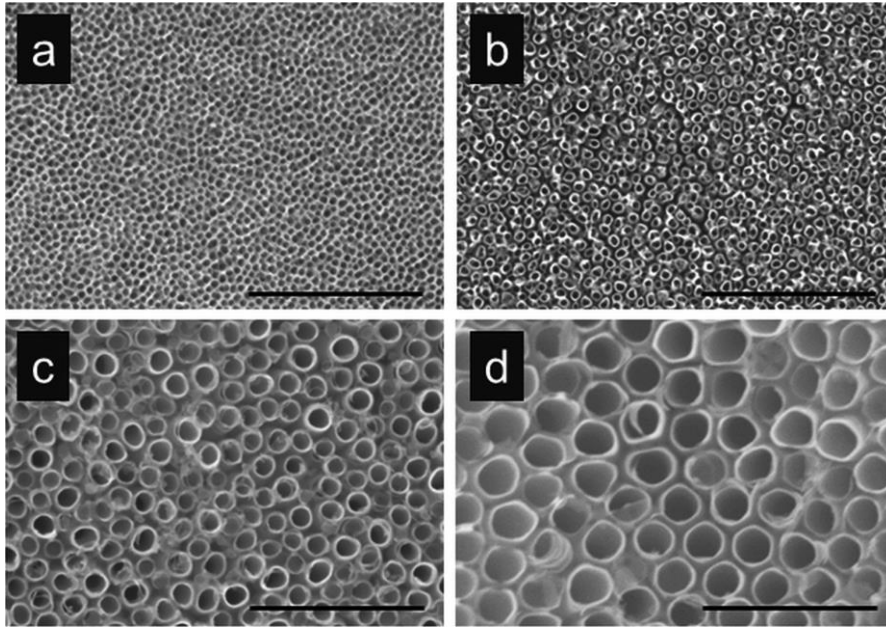
4.1 Hammasimplantin standardivaatimukset ja käytäntö uusien pinnoitteiden analysoinnissa

Uuden lääketieteellisen laitteen käyttöönotto vaatii useiden ISO-standardien mukaisten testien läpäisemisen. Hammasimplanttien yleiset vaatimukset on esitetty standardin SFS-EN 1642 luvussa neljä. Bioyhteensopivuustestien ohjeistus löytyy standardeista SFS-EN ISO 10993-1 ja SFS-EN ISO 7405:2018:en, jossa on lisäksi esitetty testejä spesifisesti hammaslääketieteessä käytettäville materiaaleille. Hammasimplanttien mekaanista kestävyyttä tulee puolestaan testata SFS-EN ISO 14801 -standardin mukaisesti.

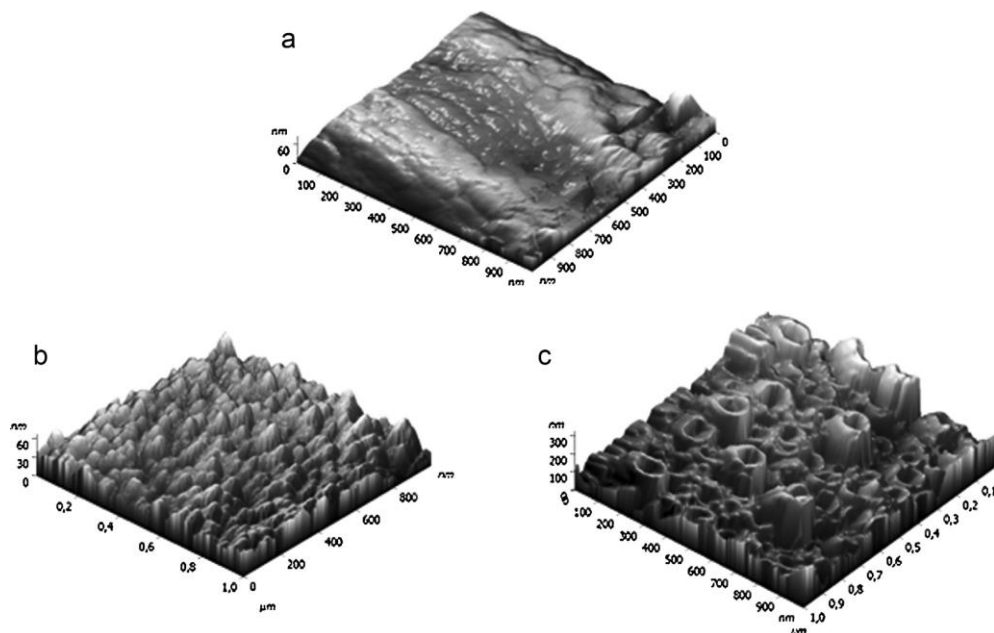
Uusien pinnoitemateriaalien tutkimuksissa biologisia ja rakennetta kuvaavia analysointimenetelmiä käytetään ennustamaan potentiaalisuutta lääketieteellisiin sovellutuksiin. Tällaisia alustavia bioyhteensopivuustestejä ovat esimerkiksi in vitro suoritettavat sytotoksisuus- ja antimikrobisuustestit (29). Biologisista testeistä kerrotaan seuraavissa alaluvuissa tarkemmin. Taulukkoon 1 on puolestaan koottu yleisimpiä pinnoitteiden rakennetta kuvaavia analysointilaitteistoja, joiden tuottamia kuvia ovat kuva 3 ja kuva 4.

Taulukko 1. Yleisiä pinnoitteen rakennetta kuvaavia analysointilaitteistoja.

Analysointimenetelmä	Karakterisointi ja merkittävyys
Scanning electron microscopy (SEM)	SEM:n avulla voidaan analysoida tutkittavan pinnan topografiaa, erityisesti huokoskokoa ja niiden homogeenisyyttä (30). Pinnanmuodot vaikuttavat bakteerien ja solujen kiinnittymiseen.
Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)	EDS kertoo pinnoitteen kemiallisesta alkuainekoostumuksesta (30). Täten voidaan tarkistaa materiaalin sisältävän haluttuja alkuaine-elementtejä.
Atomic force microscope (AFM)	AFM:n avulla määritetään pinnoitteen kvantitatiivinen, kolmiulotteinen karkeus (30), jolla on vaikutusta erityisesti luutumiseen.
X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)	XPS-analyysillä saadaan tarkimmin ilmi materiaalin pinnan uloimman kerroksen ainekoostumus ja eri aineiden prosentuaalinen suhde (30). Näin voidaan tarkistaa esimerkiksi epäpuhtauksien suhteellista määrää pinnoitteessa.
X-ray diffraction (XRD)	XRD identifioi pinnoitteen aineiden kristallirakenteen, faasiprofiilit ja näiden muutokset (31,32). Korkeampi kristallisuusaste lisää solujen aktiivisuutta (32).



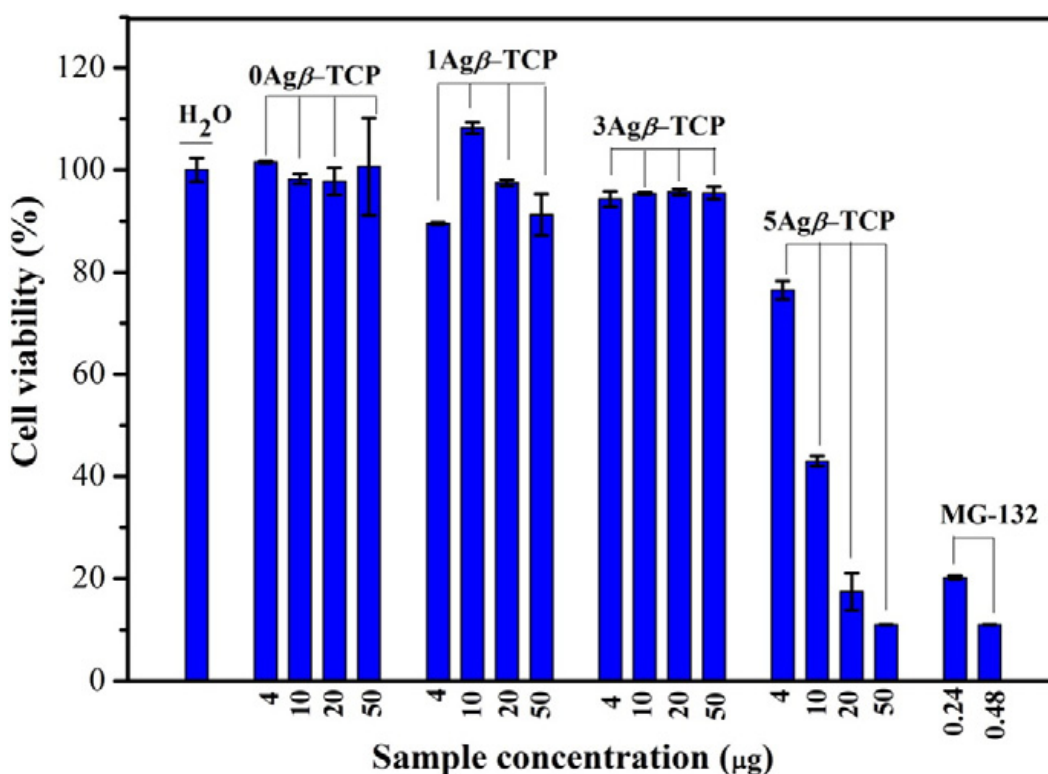
Kuva 3. SEM-kuvat TiO_2 -nanopinnoinneesta. Halkaisijat: a) 15 nm (nanohuokonen); b) 15 nm (nanoputki); c) 50 nm (nanoputki); d) 100 nm (nanoputki) (33).



Kuva 4. AFM-kuvat TiO_2 -nanopinnoinneesta: a) käsittlemätön titaani; b) 15 nm nanohuokospinnoite; c) 100 nm nanoputkipinnoite (33).

4.2 Sytotoksisuus

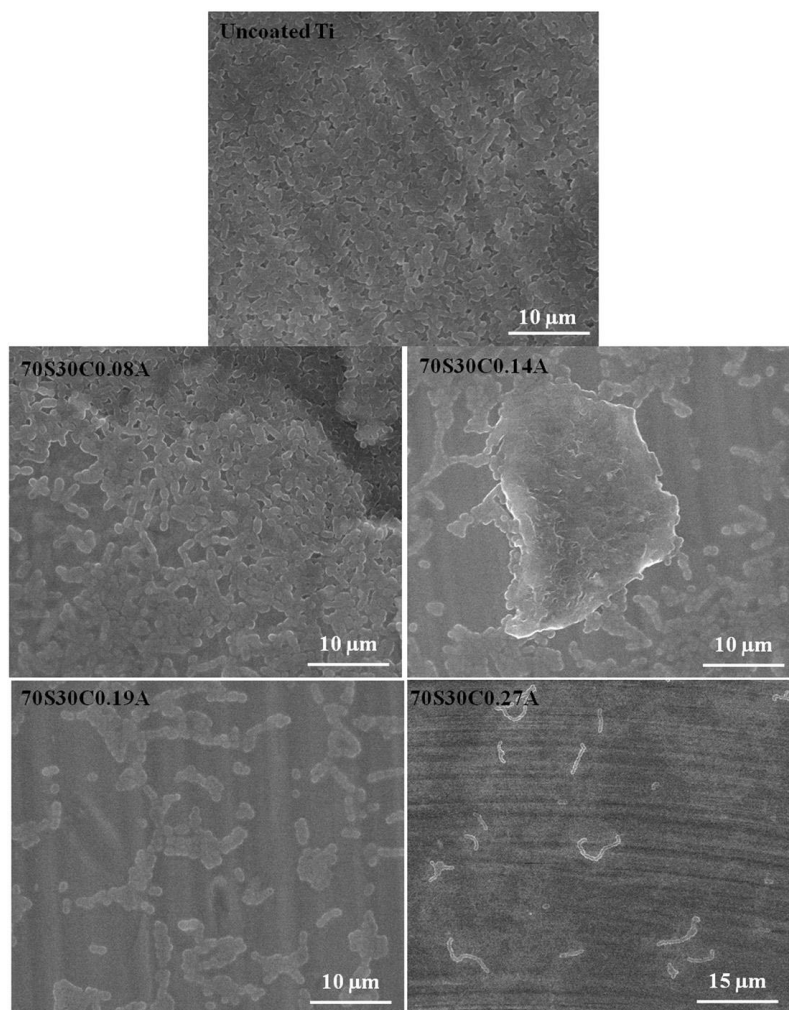
Bioyhteensopivuustesteistä sytotoksisuutta suositetaan pilottitestinä, sillä se on tärkeä tekijä lääketieteellisen laitteen arvioinnissa, minkä lisäksi testi on yksinkertainen, nopea ja sillä on korkea herkkyysaste (34). Sytotoksisuusanalysoinneissa soluja kasvatetaan joko petrialjoilla (kontaktitutkimus, direct contact assay) tai kuoppalevyillä (extraction assay). Kontaktitutkimuksissa pinnoitenäyte asetetaan soluja sisältävälle petrialjalle, kun taas eristystutkimuksissa pinnoitenäyte inkuboidaan steriilissä elatusaineessa, joka siirretään inkubaation jälkeen solujen päälle. 24 tunnin uuden inkubaation jälkeen elatusaine poistetaan (kontaktitutkimuksessa myös pinnoitenäyte poistetaan), solupopulaatioiden viabiliteettia tutkitaan soluvärjäyksen avulla ja sitä verrataan kontrolliin (35). Kuvassa 5 on esitetty Singhin ja kollegoiden tutkimuksesta lainattu kuva pinnoitteen sytotoksisuudesta osteoblasteja kohtaan.



Kuva 5. Elävien osteoblastisolujen lukumäärä neljän päivän jälkeen eri määrän hopeaa sisältävien $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ /kitosaanihybridipinnoitteiden päällä (36).

4.3 Antimikrobisuus

Pinnoitteen antimikrobisuuden analysoinnissa tutkitaan usein tiettyjen bakteerilajien lisääntymistä pinnoitteen ympäristössä. Ennen bakteerien, kuten yleisesti tutkittujen *S. aureuksen* ja *E. colin* lisääystä testipinnoitteisiin, pinnat steriloidaan autoklaavissa. Kasvatusliuoksessa inkuboidut bakteerit lisätään bakteeriliuoksena petrimaljalla olevalle steriloidulle pinnoitteelle. Tätä seuraa yhtämittainen inkubaatio 37 °C-asteessa, minkä aikana maljalta otetaan näytteitä tietyn väliajoin elävien bakteerien kvantifioimiseksi. Testi suoritetaan yleensä useamman kerran ja tulosten keskiarvot lasketaan, jolloin analysoinnin tulokseksi määräytyy keskimääräinen elävien bakteerien vähentyminen pinnoitteessa per aikayksikkö (36,37). Bakteriaalista kiinnittymistä voidaan analysoida ympäristöllisen elektronimikroskoopin avulla (environmental scanning electron microscope, ESEM). Laitteistolla kyetään tavallisesta elektronimikroskoopista poiketen kuvaamaan kosteita metallipintoja, mikä sallii biologisen näytteen kuvaamisen sen normaaleissa olosuhteissa (38). Kuvassa 6 on E-SEM-laitteistolla otettuja kuvia *S. aureus* -bakteereista hopeaa sisältävissä titaanipinnoitteissa.



Kuva 6. ESEM-kuva *S. aureus* kiinnittymisen ja lisääntymisen vähentymisestä hopeamäärän kasvaessa pinnoitteessa (38).

4.4 Bioaktiivisuus

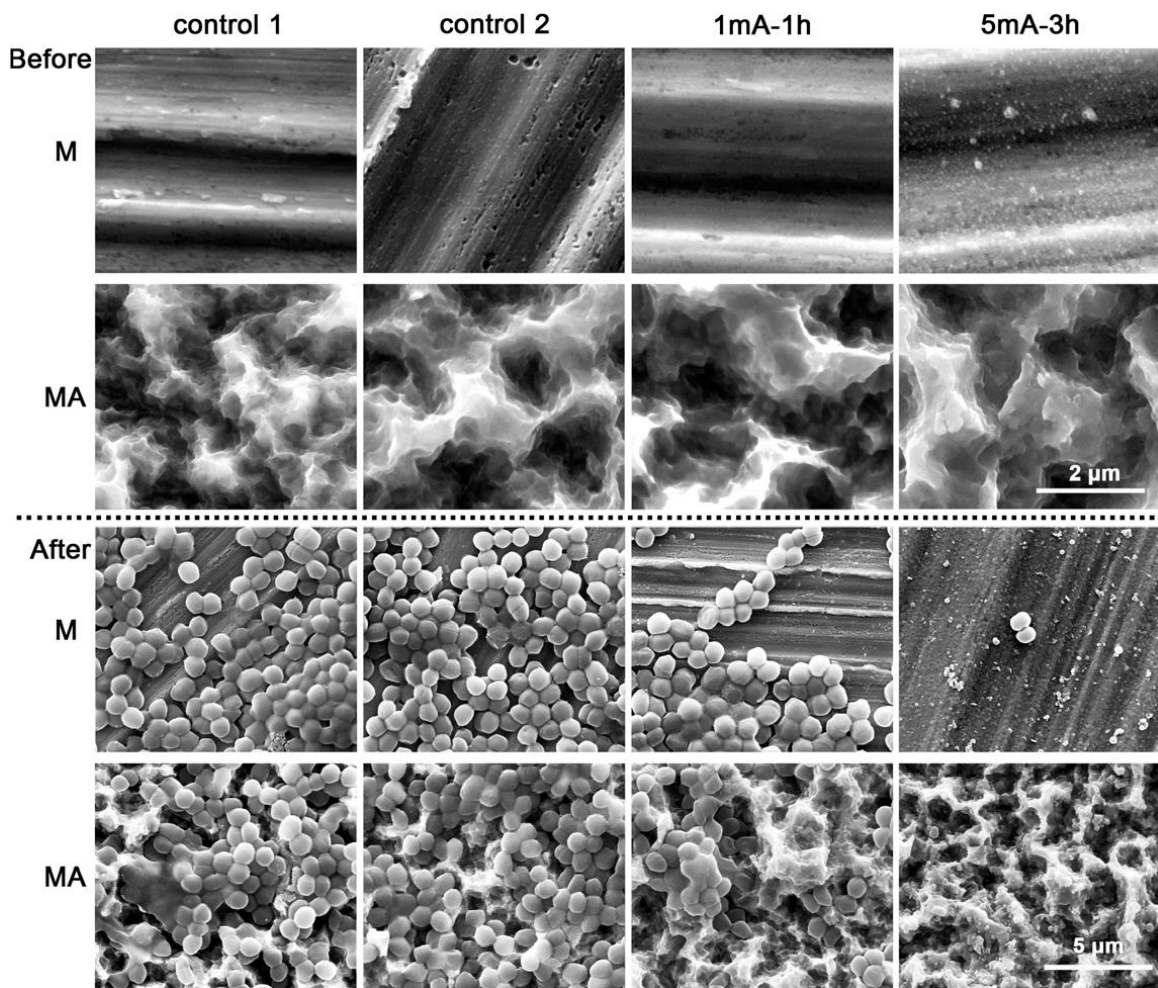
Pinnoitteen bioaktiivisuutta voidaan analysoida tutkimalla esimerkiksi hydroksiapatiitin muodostumista materiaalin pinnalle. Testeissä pinnoitenäyte asetetaan useiksi päiviksi 37 °C-asteiseen SBF-liuokseen, joka on ionikoostumukseltaan lähes vastaava kuin ihmisen plasma fysiologisessa pH:ssa (pH 7,4). Liuos vaihdetaan joka toinen päivä, jotta ionien määrä ei vähentyisi. Liuoksessa pidon jälkeen pinnoitenäytteet huuhdellaan vedellä kevyesti ja kuivataan ennen SEM-EDX -spektroskopointia. Pinnoitteen bioaktiivisuutta arvioidaan muodostuneiden hydroksiapatiittikerrosten määrästä tai massasta (38).

4.5 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR:ssä (quantitative real time PCR) tutkitaan esimerkiksi osteoblasteille merkityksellisten geenien ilmenemistä analysoimalla pinnoitteessa olevien solujen RNA-tuotantoa. ALP-entsyymi on keskeisessä asemassa osteoblastien erilaistumisessa, minkä vuoksi kyseistä entsyymiä tuottavan geenin ilmentyminen materiaalin ympäristössä on osoitus testattavan materiaalin kyvystä edistää osseointegraatiota (36).

4.6 Biofilmin muodostuminen

Pinnoitemateriaalin kykyä estää biofilmien muodostumista voidaan analysoida esimerkiksi Xingin ja kollegoiden tutkimuksen mukaisesti: Kahdeksan pinnoitetta, jotka olivat erilaisia antibioottimäärältään, pinnanmuodoiltaan tai sähköistämisen seurauksena polarisaation suhteen, altistettiin *S. epidermis* -bakteeri-inkubaatiolle kuuden tunnin ajaksi. Näytteiden päälle muodostuneet biofilmit värjättiin safraniinilla ja pestiin PBS-puskuriliuoksella. Kuivauksen jälkeen safraniiniväriaine liuotettiin etikkahappoon ja sen optinen tiheys mitattiin. Biofilmien esiintyminen pinnoilla vahvistettiin kenttäemissioelektronimikroskoopilla (field emission scanning electron microscope, FE-SEM). Kuuden tunnin inkubaation jälkeen näytteet huuhdeltiin PBS-puskuriliuoksella ja lisättiin glutaraldehydifosfaattiliuokseen. Tätä seurasi kuivaaminen etanolilla ja sputterointi palladiumilla FE-SEM-kuvausta varten. Kuvien (kuva 7) perusteella biofilmin määrä väheni suoraan verrannollisesti pinnoitteen sisältämän antibiootin määrän mukaan (39).



Kuva 7. FE-SEM-kuvat *S. epidemis* -inkubaation jälkeen eri pinnoilla. M: hiottu pinta; MA; hiottu ja etsattu pinta. Kontrolli 1: ei polarisaatiota/antibioottia; kontrolli 2: ei antibioottia; 1mA-1h polarisoitu antibiootein tunnin ajan tiheysvirralla 1mA cm^{-2} ; 5mA-3h polarisoitu kolmen tunnin ajan tiheysvirralla 3mA cm^{-2} (39).

5 Hammasimplantteihin sopivat antifouling-pinnoitemateriaalit

Tässä luvussa käsitellään titaanista valmistettujen hammasimplanttien päällystämiseen mahdollisesti sovellettavia antifouling-materiaaleja sekä esitellään muutamia pinnoitteita tarkemmin. Useita erilaisia materiaaleja on testattu alustavasti päällystämässä. Tässä luvussa niistä esitellään vain sellaisia, joiden tutkimuksissa oli mainittu sekä osseointegraation että antimikrobisuuden parantuminen.

5.1 Titaanipinnoitteet

Titaanin pintaa päällystää normaalisti ohut happikerros, joka muodostuu metallin altistuessa ilmalle. Tämä kerros on kuitenkin liian ohut aktivoimaan tärkeitä biologisia interaktioita implantoinnin onnistumiseksi. Pinnan biologisia ominaisuuksia kuten osseointegraatiokykyä voidaan parantaa päällystämällä titaani-implantti titaanioksidilla, joka samalla estää bakteerien kiinnittymistä (40,41). Titaanioksidipinnoite suojaa lisäksi implanttia kehon nesteiltä, jotka aiheuttavat implanteissa korroosiota (42).

Toinen titaaniin perustuva pinnoitemateriaali on titaaninitridi (TiN), jonka on todettu vähentävän *S. mutansin* ja *S. sanguinisin* kiinnittymistä, kun vertailumateriaalina on ollut pelkkä titaani (43). TiN-pinnoite ei kuitenkaan vähennä luutumistapahtumaan vaikuttavien fibroblastien kiinnittymistä ja sen on todettu lisäävän osteoblastien jakautumista (44,45). Vaikka titaanin seokset vaikuttavat tutkimusten perusteella lupaavilta, kliinisiä tutkimuksia niistä on kuitenkin vasta vähän.

5.2 Hiilestä valmistetut pinnoitteet

Hiili toimii todistetusti (46) inerttinä päällystysaineena suhteessa etsausaineeseen, joten hiilestä valmistetut ohuet pinnoitefilmit ovat vakaita. Grabarczykin ja kollegoiden mukaan ne ovat myös biologisesti ja kemiallisesti

stabiileja in vitro ja in vivo -tutkimuksissa. Korroosioresistenssia voidaan kasvattaa edelleen lisäämällä ioneja plasman avulla tai suoralla hiilien sitoutumisella hiilestä valmistettuun pinnoitemateriaaliin, jonka kemiallinen koostumus on $\text{Ti}_{0,5}\text{O}_{0,3}\text{C}_{0,2}$. Hiili vaikuttaa lupaavalta pinnoitemateriaalilta, mutta kuten monien muidenkin pinnoitemateriaalien kohdalla, klinisiä tutkimuksia ei ole tai niitä on vain vähän (46).

5.3 Bisfosfonaatit

Bisfosfonaattien on tutkitusti todettu toimivan osteoklastien inhibiittoreina, jolloin luun resorption määrä vähenee ja täten luun kypsyminen ja kasvu eivät inhiboidu (47). Bisfosfonaateilla on lisäksi suora vaikutus osteoblasteihin. Tutkimusten (48) mukaan osteoblastit erilaistuvat ja toimivat aktiivisina, mikäli ne ovat yhteydessä bisfosfonaatteihin. Yoshinari kollegoineen uskoo bisfosfonaattien parantaneen tutkimuksissaan osseointegraatiota mahdollisesti kahdella eri tavalla: bisfosfonaattien osteofiilisyyden vuoksi osteoblastien kiinnittyminen ja jakautuminen implantin pinnalla kasvavat. Toisaalta suurempi luun tiheys implanttia ympäröivissä kudoksissa voi olla vastuussa osteoklastien aktiivisuuden inhiboimisessa ja tällöin osteoblastit puolestaan aktivoituisivat bisfosfonaattien vaikutuksesta (47).

Bisfosfonaattien yksi tärkeimmistä kohde-entsyymeistä on tyrosiinifosfataasi, jolla on tärkeä rooli osteoklastien muodostuksessa ja toimivuudessa. Tästä syystä bisfosfonaattien käyttäminen implanttien päällystämässä jakaa mielipiteitä, sillä bisfosfonaatit toimivat selektiivisesti osteoklastien inhibiittoreina, millä voi olla negatiivinen vaikutus implantin pitkäaikaiseen toimivuuteen. Bisfosfonaatteja ei vielä ole sovellettu klinisiin tutkimuksiin (3).

5.4 Hydroksiapatiitti ja muut kalsiumfosfaattipinnoitteet

Kalsiumfosfaattipinnoitteet ovat tutkimusten mukaan bioyhteensopivia sekä luunmuodostusta lisääviä. Hydroksiapatiittipinnoite (ha-pinnoite) yhdistää

metallin kestävyys ja kalsiumfosfaatin bioaktiivisuuden. Vaikka ha-pinnoitteita on tutkittu laajasti ja niiden on osoitettu olevan hyvin soveltuvia implanttipinnoitteita, ha-pinnoitteiden pitkäaikaisennusteet ovat edelleen kiistanalaisia (28). Hydroksiapatiitin on todettu kuitenkin pinnoitteessa kasvattaneen materiaalin kestävyttä suoria voimia vastaan implantoinnissa (49). Lisäksi tutkimusten mukaan implanttia ympäröivässä kudoksessa ei todettu tulehdussoluinfiltraattia 14 observointivuoden aikana, mikä indikoi ha-pinnoitteen kestävyttä pitkällä aikavälillä (49,50). Niiden on myös todettu toimivan potentiaalisina bioaktiivisten molekyylien kuten vankomysiinantibiootin kuljettimina (21). Antibioottien käytöstä pinnoitteissa kerrotaan alaluvussa 4.6 enemmän.

5.5 Polyetyleeniglykolipinnoitteet

Yksi yleisimmistä keinoista luoda materiaalille kyky vastustaa mikrobien, kuten *Staphylococcus aureuksen* ja *Staphylococcus epidermiks*en, kiinnittymistä on pinnoittaa materiaali polyetyleeniglykolilla (PEG). Vaikka PEG-pinnoitus itsessään heikentää osteoblastien toimintaa, pinnoitteeseen voidaan immobilisoida bioaktiivisia molekyylejä, kuten serisiiniä. Tällöin osteoblastien toiminta tehostuu ja pinnan antibakteriaaliset ominaisuudet säilyvät (21). Tutkimusten mukaan proteiinien lähestyminen kohti tutkittavan materiaalin pintaa saa aikaan PEG-ketjujen tiivistymisen, jolloin proteiineja vastaan muodostuu repulsiivisia elastisia voimia. Vesimolekyylien poistuminen hydratoituneista polymeeriketjuista tiivistymisen aikana luo lisäksi termodynaamisesti epäsuotuisan osmoottisen tilan, mikä yhdessä elastisten voimien kanssa lisää materiaalin pinnan proteiiniresistenttiyttä (20). Käytännössä tämä tarkoittaa bakteerien kiinnittymisen heikentymistä, mikä vähentää bakteerien kykyä muodostaa osseointegraatiota vaarantavia biofilmejä.

5.6 Antibiootteja vapauttavat pinnoitteet

Ennen kuin antibiooteilla pinnoitettuja implantteja voidaan soveltaa klinikkaan, useat ongelmakohdat täytyy ratkaista. Implanttien ympäriltä eristettyjen

bakteerien on todettu muodostavan resistenssin lääkaineille, minkä vuoksi tehokkaan antibiootin valitseminen pinnoitteeseen on erityisen tärkeää (51). Lisäksi on vaikeaa tuottaa pinnoite, joka vapauttaa pitkäaikaisesti, tasaisesti ja efektiivisen määrän antibioottia. Liian pienen määrän vapautuessa bakteerien antibioottiresistenttityden riski kasvaa, joten antibioottien vapautumisen tulisi olla riittävän runsasta tarpeeksi pitkään. Toisaalta antibioottien vapautumisen tulisi loppua ajallaan, jottei resistentsi syntyisi (21). Antibioottien liiallinen määrä pinnoitteessa lisäksi vaikuttaa solutoimintoihin negatiivisesti (52,53). Näiden syiden vuoksi antibioottien vaikutus kudosisintegraatioon implanttien ympärillä on otettava huomioon kehitettäessä antibiootteja sisältäviä implanttipinnoitteita.

Kalsiumfosfaattien lisäksi biohajoavia polymeerejä ja sol-gel-pinnoitteita käytetään kontrolloituun antibioottien vapauttamiseen titaani-implanteista (54). Sol-gel-pinnoituksessa nestemäinen, haluttua pinnoiteainetta sisältävä kolloidiliuos eli sooli, muunnetaan kiinteäksi geeliksi, johon pinnoitettava materiaali kastetaan (55). Optimoitu monikerroksinen vankomysiiniä sisältävä silika-sol-gel -pinnoite vapauttaa tasaisesti vankomysiiniä, jonka määrä riittää tutkimusten (54) mukaan estämään *Staphylococcus aureus* kasvuun.

Antibiootteja kuten muitakin lääkaineita voidaan sitoa kovalenttisesti titaaniin. Vankomysiini-antibiootin on todettu säilyttävän antibakteriaalisen aktiivisuutensa jopa 44 päivää biologisen suolaliuosinkubaation jälkeen (56). Toisin kuin ei-kovalenttisesti sitoutuneena, kovalenttisesti sitoutunut vankomysiini ei vapaudu pinnoitteesta bakteeri-inkubaatiossa, jolloin sitä ei siis kulkeutuisi elimistöön aiheuttamaan mahdollisia sivuoireita. Kovalenttisesti sitoutuneen antibiootin tehosta bakteereja vastaan in vivo ollaan kuitenkin vielä epävarmoja, sillä implantoinnin jälkeen muodostuva proteiinkerros implantin päällä saattaa vaikuttaa antibioottien tehoon (21).

5.7 Ei-antibioottiset antimikrobiset tekijät pinnoitteissa

Antibioottien sisällyttäminen pinnoitteisiin lisää antibioottiresistenssin syntymisen riskiä, minkä vuoksi ei-antibioottisten antimikrobisten tekijöiden kuten klooriheksidiinin, kloroksylenolin tai polyheksametyleenibiguanidin lisääminen pinnoitteisiin on vaihtoehtoinen ratkaisu. Kyseisiä aineita käytetään päivittäin niiden antimikrobisten ominaisuuksien ja vähäisen lääkeaineresistenssitodennäköisyyden vuoksi esimerkiksi suuvesissä (21). Eri keinoja lisäämään kyseisiä aineita pinnoitteisiin, kuten TiN-pinnoitteisiin, on kehitetty ja niiden vapautumista pinnoitteesta voidaan säädellä valmistustapaa muuttamalla, mutta ongelmia on kuitenkin raportoitu: monien tutkimusten mukaan orgaaniset antimikrobitekijät voivat aiheuttaa soluvaurioita (52,57).

Edellä mainittujen orgaanisten ei-antibioottisten antimikrobisten tekijöiden lisäksi vastaavia epäorgaanisia tekijöitä on sovellettu pinnoitemateriaaleihin. Tunnetuin tällainen tekijä on hopea, jonka useat hyödylliset ominaisuudet on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Hopean ominaisuuksia implanteissa.

Ominaisuus	Tutkimuslähde
1. Antibakteerinen monille eri bakteerilajeille	(58)
2. Estää bakteerien kiinnittymistä biomateriaaliin	(59)
3. Antibakteriaalinen teho säilyy pitkään	(60)
4. Hopearesistenssin synty erittäin harvinaista	(61)
5. Ei paikallisia tai systeemisiä sivuvaikutuksia	(62)
6. Soveltuu eri valmistusmenetelmiin (esimerkiksi sputterointi, plasmaimmersio ja vaporisointidepositio)	(63-66)
7. Soveltuu useisiin pinnoitemateriaaleihin (esimerkiksi polymeerit, hiili, bioaktiivinen lasi, keraamiset aineet ja metallit)	(63,64,67,68)

Hopean on todettu inhiboivan tehokkaasti bakteriaalista kiinnittymistä ja kasvua vaikuttamatta osteoblastien ja epiteelisolujen aktiivisuuteen (65,66). Hopean antimikrobinen mekanismi on erittäin monimutkainen tapahtuma, johon on ehdotettu eri teorioita. Hopeaionien sitoutuminen solun pintaan muuttaa solukalvon rakennetta, permeabiliteettia ja se inaktivoi eri proteiineja. Lopuksi hopeaionit tunkeutuvat solun sisään ja vaikuttavat solun proteiinisynteesiin ja nukleiinihapporeplikaatioon, mikä johtaa lopulta solukuolemaan (37).

5.8 Antibakteeriset bioaktiiviset biopolymeerit

Kitosaani on polysakkaridi, jota voidaan valmistaa esimerkiksi niveljalkaisten eläinten tukirangan kitiinistä. Kitosaanilla on todettu olevan useita merkittäviä biologisia ominaisuuksia: bioyhteensopivuus, biohajoaminen vaarattomiksi tuotteiksi, myrkyttömyys, inerttisyys, suuri affiniteetti proteiineihin ja antimikrobiaalisuus (69). Sen on myös todettu stimuloivan haavojen parantumista sekä lisäävän osteoblastien aktiivisuutta, erilaistumista, kiinnittymistä ja

jakautumista (70). Kitosaanin soluadheesiokyky perustunee sen vahvaan kationiseen varaukseen: Haipeng ja kollegat totesivat solunulkoisen matriksin molekyyliden kuten laminiinin ja fibronectiinin adsorboituvan kitosaaniin suurissa määrin (71). Nämä molekyylit puolestaan lisäävät osteoblastien ja muiden luutumiseen tarvittavien solujen kiinnittymistä (72). Tutkimukset ovat edellä mainitsemilla tavoilla osoittaneet kitosaanin olevan hyvin potentiaalinen pinnoitemateriaali. Lisätutkimuksia on kuitenkin tehtävä muun muassa kitosaanipinnoitteen vahvuuden optimoimiseksi fysiologisissa olosuhteissa ottaen huomioon sterilisaation vaikutukset pinnan eri ominaisuuksiin (70). Myöskään in vivo -todisteita kitosaanin paremmuudesta verrattuna esimerkiksi kalsiumfosfaattiin ei ole.

5.9 Eri materiaaleja yhdistävät pinnoitteet

Eri aineita voidaan yhdistää pinnoitteisiin, jotta materiaalilla olisi mahdollisimman monipuoliset ominaisuudet. Esimerkki tällaisesta materiaalista on Singhin ja kollegoiden valmistama hopeaa sisältävä $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ /kitosaanihybridipinnoite, jossa kalsiumfosfaatin luunkaltaiset biokemialliset ja kristallografiset ominaisuudet yhdistyvät kitosaanin ominaisuuksien, kuten korkeaan proteiiniaffiniteetin sekä hopean antimikrobisuuden kanssa. Materiaalin rakenneanalysoinnissa hopean todettiin sitoutuneen onnistuneesti kalsiumin paikalle $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -kiderakenteessa. Hopean lisääminen materiaaliin vähensi myös huokoisuutta ja turpoamisominaisuuksia, mikä puolestaan lisäsi pinnoitteen korroosiokestävyyttä ja mekaanista kiinnittymistä titaaniin. Hopea lisäksi paransi antibakteriaalisuutta eikä sen sytotoksisuutta pidetty merkittävänä tiettyyn hopeapitoisuuteen ($3\text{Ag}\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ /kitosaani) saakka. Lopuksi hopean todettiin vielä lisänneen alkalisen fosfataasin (*alkaline phosphatase*, ALP) geeniekspressiota. Kyseinen geeni on merkittävässä asemassa osteoblastien erilaistumisessa (36). Näiden tulosten perusteella $3\text{Ag}\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ /kitosaanihybridipinnoitteella olisi erittäin potentiaaliset mahdollisuudet käytettäväksi kliinisissä sovellutuksissa.

6. Yhteenveto

Hampaiden menetykset assosioituvat OHRQoL:n heikentymiseen (1,2). Puuttuvia hampaita voidaan kuitenkin korvata muun muassa hammasimplantein. Implantin ympärillä oleva pehmytkudos on pitkälti ulkoisesti ja rakenteellisesti parodontaalista pehmytkudosta vastaava, minkä lisäksi implantin luutuminen muistuttaa pääosin luumurtuman parantumista (7,9,13). Titaanista valmistetut hammasimplantit johtavat kuitenkin usein implanttia ympäröivän kudoksen tulehtumiseen bakteeriaalisen infektion vuoksi, mikä voi johtaa implantin menettämiseen. Tästä syystä mikrobien kiinnittymistä estävien antifouling-pinnoitemateriaalien kehittäminen on tärkeää. Lisäksi pinnoitteiden tulisi parantaa implantin luutumista (21).

Bakterisidaalisen pinnoitteen, kuten antibioottipinnoitteen, avulla voidaan estää bakteerien aiheuttamien biofilmien muodostumista. Biofilmit haittaavat luutumista ja saavat aikaan tulehdusreaktion (20). Pinnoitteen pintaominaisuuksia muuttamalla bakteerien adheesiokykyä pinnoitteeseen voidaan vähentää ja samalla lisätä luun muodostusta edistävien solujen kiinnittymistä (73). Pinnoitemateriaaleja voidaan analysoida rakennetta kuvaavien menetelmin, kuten SEM:n, XPS:n ja XRD:n avulla (30) tai suorittamalla bioyhteensopivuustestejä, joista yleisimpiä ovat sytotoksisuutta ja antimikrobiaalisuutta mittaavat testit (28).

Useita materiaalivaihtoehtoja titaanista valmistettujen hammasimplanttien päällystämiseksi on esitetty. Tutkituimpiin ja potentiaalisimpiin materiaaleihin kuuluvat muun muassa hydroksiapatiitti- ja titaanioksidipinnoitteet (3). Myös eri materiaalien yhdistäminen ja lääkeaineiden sitominen pinnoitteisiin ovat osoittautuneet tutkimusten perusteella varteenotettaviksi vaihtoehdoiksi (21,36).

Testivertailuja eri pinnoitteiden kesken ei ole suoritettu, joten tämän syventäväksi tutkielmaksi tarkoitetun kirjallisuuskatsauksen perusteella on vaikea arvioida yhtä

pinnoitemateriaalia ylitse muiden. Tästä syystä olisi suoritettava lisätutkimuksia, joissa vertailtaisiin potentiaalisimpia pinnoitemateriaaleja. Lisäksi pitkäaikaisia ja klinisiä tutkimuksia olisi tehtävä, jotta pinnoitteita voitaisiin soveltaa käytäntöön hammaslääketieteessä, sillä useimmista pinnoitevaihtoehdoista on tehty vain alustavia bioyhteensopivuustestejä.

Lähdeluettelo

- (1) Gerritsen AE, Allen PF, Witter DJ, Bronkhorst EM, Creugers NH. Tooth loss and oral health-related quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Health and quality of life outcomes* 2010;8(1):126.
- (2) Reissmann DR, Dard M, Lamprecht R, Struppek J, Heydecke G. Oral health-related quality of life in subjects with implant-supported prostheses: A systematic review. *Journal of Dentistry* 2017 October 2017;65:22-40.
- (3) Xuereb M, Camilleri J, Attard NJ. Systematic review of current dental implant coating materials and novel coating techniques. *Int J Prosthodont* 2015;28(1).
- (4) Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thorsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res* 1991;2(2):81-90.
- (5) Banerjee I, Pangule RC, Kane RS. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms. *Adv Mater* 2011;23(6):690-718.
- (6) Buxadera-Palomero J, Canal C, Torrent-Camarero S, Garrido B, Javier Gil FJ, Rodríguez D. Antifouling coatings for dental implants: Polyethylene glycol-like coatings on titanium by plasma polymerization. *Biointerphases* 2015;10(2).
- (7) Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Newman and Carranza's *Clinical Periodontology E-Book*. : Elsevier Health Sciences; 2018.
- (8) Rose LF, ...[et al.]. *Periodontics: medicine, surgery, and implants*. : Elsevier Mosby St. Louis^ eMissouri Missouri; 2004.
- (9) Hupp JR, Tucker MR, Ellis E. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery-E-Book*. : Elsevier Health Sciences; 2013.
- (10) Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Biologic width around titanium implants. A histometric analysis of the implanto-gingival junction around unloaded and loaded nonsubmerged implants in the canine mandible. *J Periodontol* 1997;68(2):186-197.

- (11) Kan JY, Rungcharassaeng K, Umezu K, Kois JC. Dimensions of peri-implant mucosa: an evaluation of maxillary anterior single implants in humans. *J Periodontol* 2003;74(4):557-562.
- (12) Linkevicius T, Apse P. Biologic width around implants. An evidence-based review. *Stomatologija* 2008;10(1):27-35.
- (13) Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000* 1998;17(1):22-35.
- (14) Huwiler M, Pjetursson BE, Bosshardt D, Salvi G, Lang NP. Resonance frequency analysis in relation to jawbone characteristics and during early healing of implant installation. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(3):275-280.
- (15) Glauser R, Sennerby L, Meredith N, R  e A, Lundgren A, Gottlow J, et al. Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading: successful vs. failing implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(4):428-434.
- (16) Scarano A, Degidi M, Iezzi G, Petrone G, Piattelli A. Correlation between implant stability quotient and bone-implant contact: a retrospective histological and histomorphometrical study of seven titanium implants retrieved from humans. *Clin Implant Dent Relat Res* 2006;8(4):218-222.
- (17) Godoy-Gallardo M, Mas-Moruno C, Yu K, Manero JM, Gil FJ, Kizhakkedathu JN, et al. Antibacterial Properties of hLf1–11 Peptide onto Titanium Surfaces: A Comparison Study Between Silanization and Surface Initiated Polymerization. *Biomacromolecules* 2015;16(2):483-496.
- (18) Jurczyk K, Kubicka M, Ratajczak M, Jurczyk M, Niespodziana K, Nowak D, et al. Antibacterial activity of nanostructured Ti–45S5 bioglass–Ag composite against *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 2016;26(1):118-125.
- (19) Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 Apr;15(2):167-193.

- (20) Buxadera-Palomero J, Canal C, Torrent-Camarero S, Garrido B, Gil FJ, Rodríguez D. Antifouling coatings for dental implants: Polyethylene glycol-like coatings on titanium by plasma polymerization. *Biointerphases* 2015;10(2):029505.
- (21) Zhao L, Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2009;91(1):470-480.
- (22) Godoy-Gallardo M, Guillem-Martí J, Sevilla P, Manero JM, Gil FJ, Rodríguez D. Anhydride-functional silane immobilized onto titanium surfaces induces osteoblast cell differentiation and reduces bacterial adhesion and biofilm formation. *Materials Science and Engineering: C* 2016;59:524-532.
- (23) Zhou L, Lai Y, Huang W, Huang S, Xu Z, Chen J, et al. Biofunctionalization of microgroove titanium surfaces with an antimicrobial peptide to enhance their bactericidal activity and cytocompatibility. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2015;128:552-560.
- (24) Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed research international* 2015;2015:1.
- (25) Rompen E, Domken O, Degidi M, Farias Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(S2):55-67.
- (26) Aita H, Hori N, Takeuchi M, Suzuki T, Yamada M, Anpo M, et al. The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials* 2009;30(6):1015-1025.
- (27) Del Curto B, Brunella M, Giordano C, Pedferri M, Valtulina V, Visai L, et al. Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium. *Int J Artif Organs* 2005;28(7):718-730.
- (28) Oshida Y, Tuna EB, Aktören O, Gençay K. Dental implant systems. *International journal of molecular sciences* 2010;11(4):1580-1678.

- (29) Mihailescu N, Stan G, Duta L, Chifiriuc MC, Bleotu C, Sopronyi M, et al. Structural, compositional, mechanical characterization and biological assessment of bovine-derived hydroxyapatite coatings reinforced with MgF₂ or MgO for implants functionalization. *Materials Science and Engineering: C* 2016;59:863-874.
- (30) Chrcanovic BR, Pedrosa AR, Martins MD. Chemical and topographic analysis of treated surfaces of five different commercial dental titanium implants. *Materials Research* 2012;15(3):372-382.
- (31) Sisti KE, de Rossi R, Antoniolli AMB, Aydos RD, Guastaldi AC, Queiroz TP, et al. Surface and biomechanical study of titanium implants modified by laser with and without hydroxyapatite coating, in rabbits. *J Oral Implantol* 2012;38(3):231-237.
- (32) Vasilets VN, Surguchenko VA, Ponomareva AS, Nemetz EA, Sevastianov VI, Bae JW, et al. Effects of surface properties of bacterial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) on adhesion and proliferation of mouse fibroblasts. *Macromolecular Research* 2015;23(2):205-213.
- (33) Narendrakumar K, Kulkarni M, Addison O, Mazare A, Junkar I, Schmuki P, et al. Adherence of oral streptococci to nanostructured titanium surfaces. *Dental Materials* 2015;31(12):1460-1468.
- (34) Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). *Biomedical reports* 2015;3(5):617-620.
- (35) Radu A, Eleonora C, Lucian A, Georgeta C, Virginia V, Cristiana T. In vitro biocompatibility testing of implantable biomaterials. *Roum Biotechnol Lett* 2008;13(4):3863-3872.
- (36) Singh RK, Awasthi S, Dhayalan A, Ferreira J, Kannan S. Deposition, structure, physical and invitro characteristics of Ag-doped β -Ca₃(PO₄)₂/chitosan hybrid composite coatings on Titanium metal. *Materials Science and Engineering: C* 2016;62:692-701.
- (37) Stanić V, Janačković D, Dimitrijević S, Tanasković SB, Mitrić M, Pavlović MS, et al. Synthesis of antimicrobial monophasic silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering. *Appl Surf Sci* 2011;257(9):4510-4518.

- (38) Catauro M, Bollino F, Papale F, Cipriotti SV. Investigation on bioactivity, biocompatibility, thermal behavior and antibacterial properties of calcium silicate glass coatings containing Ag. *J Non Cryst Solids* 2015;422:16-22.
- (39) Xing R, Witsø IL, Jugowiec D, Tiainen H, Shabestari M, Lyngstadaas SP, et al. Antibacterial effect of doxycycline-coated dental abutment surfaces. *Biomedical Materials* 2015;10(5):055003.
- (40) Cimpean A, Popescu S, Ciofrangeanu CM, Gleizes AN. Effects of LP-MOCVD prepared TiO₂ thin films on the in vitro behavior of gingival fibroblasts. *Mater Chem Phys* 2011;125(3):485-492.
- (41) Almaguer-Flores A, Silva-Bermudez P, Galicia R, Rodil SE. Bacterial adhesion on amorphous and crystalline metal oxide coatings. *Materials Science and Engineering: C* 2015;57:88-99.
- (42) Gazia R, Mandracci P, Mussano F, Carossa S. AlN_x and a-SiO_x coatings with corrosion resistance properties for dental implants. *Surface and Coatings Technology* 2011;206(6):1109-1115.
- (43) Größner-Schreiber B, Griepentrog M, Haustein I, Müller W, Briedigkeit H, Göbel UB, et al. Plaque formation on surface modified dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2001;12(6):543-551.
- (44) Größner-Schreiber B, Herzog M, Hedderich J, Dück A, Hannig M, Griepentrog M. Focal adhesion contact formation by fibroblasts cultured on surface-modified dental implants: an in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(6):736-745.
- (45) Durual S, Pernet F, Rieder P, Mekki M, Cattani-Lorente M, Wiskott H. Titanium nitride oxide coating on rough titanium stimulates the proliferation of human primary osteoblasts. *Clin Oral Implants Res* 2011;22(5):552-559.
- (46) Grabarczyk J, Batory D, Louda P, Couvrat P, Kotela I, Bakowicz-Mitura K. Carbon coatings for medical implants. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 2007;20(20):107-110.

- (47) Yoshinari M, Oda Y, Inoue T, Matsuzaka K, Shimono M. Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants. *Biomaterials* 2002;23(14):2879-2885.
- (48) Gandolfi M, Pugnali A, Mattioli-Belmonte M, Muzzarelli R, De Benedittis A, Mengucci P, et al. Osteoblast behaviour in the presence of bisphosphonates: ultrastructural and biochemical in vitro studies. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:327-334.
- (49) Hägi TT, Enggist L, Michel D, Ferguson SJ, Liu Y, Hunziker EB. Mechanical insertion properties of calcium-phosphate implant coatings. *Clin Oral Implants Res* 2010;21(11):1214-1222.
- (50) Iezzi G, Scarano A, Petrone G, Piattelli A. Two human hydroxyapatite-coated dental implants retrieved after a 14-year loading period: a histologic and histomorphometric case report. *J Periodontol* 2007;78(5):940-947.
- (51) Tunney MM, Ramage G, Patrick S, Nixon JR, Murphy PG, Gorman SP. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from orthopedic implants following revision hip surgery. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Nov;42(11):3002-3005.
- (52) Ince A, Schutze N, Hendrich C, Jakob F, Eulert J, Lohr J. Effect of polyhexanide and gentamicin on human osteoblasts and endothelial cells. *Swiss medical weekly* 2007;137(9-10):139-145.
- (53) Naal FD, Salzmann GM, Von Knoch F, Tuebel J, Diehl P, Gradinger R, et al. The effects of clindamycin on human osteoblasts in vitro. *Arch Orthop Trauma Surg* 2008;128(3):317-323.
- (54) Radin S, Ducheyne P. Controlled release of vancomycin from thin sol–gel films on titanium alloy fracture plate material. *Biomaterials* 2007 3;28(9):1721-1729.
- (55) Catauro M, Papale F, Bollino F. Characterization and biological properties of TiO₂/PCL hybrid layers prepared via sol–gel dip coating for surface modification of titanium implants. *J Non Cryst Solids* 2015;415:9-15.
- (56) Edupuganti OP, Antoci V, King SB, Jose B, Adams CS, Parvizi J, et al. Covalent bonding of vancomycin to Ti6Al4V alloy pins provides long-term inhibition of *Staphylococcus aureus* colonization. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17(10):2692-2696.

- (57) Harris L, Mead L, Müller-Oberländer E, Richards R. Bacteria and cell cytocompatibility studies on coated medical grade titanium surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2006;78(1):50-58.
- (58) Berger TJ, Spadaro JA, Chapin SE, Becker RO. Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1976 Feb;9(2):357-358.
- (59) Li J, Wang J, Shen L, Xu Z, Li P, Wan G, et al. The influence of polyethylene terephthalate surfaces modified by silver ion implantation on bacterial adhesion behavior. *Surface and Coatings Technology* 2007;201(19):8155-8159.
- (60) Cheng H, Li Y, Huo K, Gao B, Xiong W. Long-lasting in vivo and in vitro antibacterial ability of nanostructured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2014;102(10):3488-3499.
- (61) Percival S, Bowler P, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect* 2005;60(1):1-7.
- (62) Harges J, Ahrens H, Gebert C, Streitbuerger A, Buerger H, Erren M, et al. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans. *Biomaterials* 2007;28(18):2869-2875.
- (63) Zhang W, Luo Y, Wang H, Jiang J, Pu S, Chu PK. Ag and Ag/N 2 plasma modification of polyethylene for the enhancement of antibacterial properties and cell growth/proliferation. *Acta biomaterialia* 2008;4(6):2028-2036.
- (64) Kwok S, Zhang W, Wan G, McKenzie D, Bilek M, Chu PK. Hemocompatibility and anti-bacterial properties of silver doped diamond-like carbon prepared by pulsed filtered cathodic vacuum arc deposition. *Diamond and related materials* 2007;16(4):1353-1360.
- (65) Ewald A, Glückermann SK, Thull R, Gbureck U. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomedical engineering online* 2006;5(1):1.
- (66) Chen W, Liu Y, Courtney H, Bettenga M, Agrawal C, Bumgardner J, et al. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials* 2006;27(32):5512-5517.

- (67) Balamurugan A, Balossier G, Laurent-Maquin D, Pina S, Rebelo A, Faure J, et al. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system. *dental materials* 2008;24(10):1343-1351.
- (68) Bosetti M, Masse A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* 2002;23(3):887-892.
- (69) Kim I, Seo S, Moon H, Yoo M, Park I, Kim B, et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv* 2008;26(1):1-21.
- (70) Bumgardner JD, Wiser R, Gerard PD, Bergin P, Chestnutt B, Marini M, et al. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2003;14(5):423-438.
- (71) Haipeng G, Yinghui Z, Jianchun L, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z. Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *J Biomed Mater Res* 2000;52(2):285-295.
- (72) Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 1997;12(8):1189-1197.
- (73) Mandracci P, Mussano F, Rivolo P, Carossa S. Surface Treatments and Functional Coatings for Biocompatibility Improvement and Bacterial Adhesion Reduction in Dental Implantology. *Coatings* 2016;6(1):7.